

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kateřina Piskačová

Výskyt a úloha purinergního P2X7 receptoru v imunitním systému
Incidence and Role of the Purinergic P2X7 Receptor in the Immune System

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Zemková, CSc.

Praha, 2016

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2016

Kateřina Piskačová

Abstrakt

V současné době se ukazuje, že extracelulární ATP a jeho metabolit adenosin představují klíčové mediátory v imunitním systému. V závislosti na koncentraci může ATP působit jako aktivátor nebo inhibitor imunitní odpovědi, zatímco o adenosinu je všeobecně známo, že působí jako účinný imunosupresor. Signalizace extracelulárního ATP je detegována a přenášena purinergními P2- a adenosinová signalizace P1- receptory. V podstatě všechny buňky imunitního systému nesou na své plazmatické membráně P2X, P2Y a adenosinové P1 receptory, proto purinergní signalizace zasahuje do všech složek imunitních a zánětlivých reakcí, včetně neurodegenerativních onemocnění. Toto poznání vyvolalo vlnu zájmu o výzkum, vývoj a syntézu nových látek působících na P1- a P2-receptory, které by mohly pomoci při léčbě chronických zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění. Tato bakalářská práce se pokusí shrnout nejnovější poznatky o úloze P2X7 receptoru v těchto procesech. Tento podtyp P2-receptoru je výjimečný tím, že je zapojen do uvolňování cytokinů z imunitních buněk a hraje roli v buněčném růstu a apoptóze.

Klíčová slova:

ATP, purinergní signalizace, P2X7 receptor, imunitní systém, centrální nervový systém, gliové buňky

Abstract

It has been shown recently that extracellular ATP and its metabolite adenosine are key mediators in the immune system. Depending on the concentration, ATP may act as an activator or an inhibitor to the immune response, whereas adenosine is generally well known as a specific immunosuppressor. Signals delivered by extracellular ATP and adenosine are detected and transduced by purinergic P2- and P1- receptors, respectively. In principle, all cells of the immune system express P2X, P2Y and adenosine P1 receptors on their plasmatic membrane. Therefore, the purinergic signaling extends to all components of the immune and inflammatory responses, including neurodegenerative diseases. This knowledge triggered a wave of interest in research, development and synthesis of new compounds having effect on P1- and P2- receptors that could help in the treatment of chronic inflammatory diseases and neurodegenerative diseases. This bachelor thesis will summarize the most recent knowledge on the role of the P2X7 receptor in these processes. This subtype of P2-receptor is unique because it is involved in the release of cytokines from immune cells and plays a role in the cell growth and apoptosis.

Key words:

ATP, purinergic signalization, P2X7 receptor, immune system, central nervous system, glial cells

Seznam nejdůležitějších zkratk

A β	β -amyloidní peptid
ACP	kyselá fosfatázá (acid phosphatase)
AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease)
ADP	adenosin-5'-difosfát
ALP	alkalická fosfatázá (alkaline phosphatase)
AMP	adenosin-5'-monofosfát
APC	buňky prezentující antigen (antigen-presenting cell)
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosin-5'trifosfát
BBG	modré barvivo Brilliant Blue G
BzATP	2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
CD73	ekto-5'-nukleotidáza, která vytváří z AMP adenosin
CNS	centrální nervový systém
DAMP	všudypřítomný signál poškození nebo ohrožení (damage-associated molecular pattern)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
(E-)NPPáza	(ekto-)nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesteráza
(E-)NTPDáza	ekto-nukleosid trifosfátdifosfohydroláza
G _{q/11} ; G _q	G-protein, který aktivuje fosfolipázu C
G _{i/Go}	inhibiční G-protein (G inhibitory)/jiný G-protein (G other)
G _s	stimulační G-protein (G stimulatory)
HD	Huntingtonova nemoc (Huntington's disease)
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky z linie č. 293 (Human Embryonic Kidney Cells 293)
IL-1 β	interleukin 1 β
LPS	lipopolysacharidy
NLRP3	protein ze skupiny NLRP, tvoří proteinový komplex inflamazom (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NMDG	N-metyl-D-glukamin

P1	adenosinové receptory
P2X	ionotropní purinergní receptor
P2Y	metabotropní purinergní receptor
PAMP	molekulární vzor spojení s patogenem (Pathogen Associated Molecular Patterns)
PD	Parkinsonova nemoc (Parkinson's disease)
PPADS	pyridoxal-5'-fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonát
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TLR	toll-like receptor
TM1 a TM2	transmembránové domény 1 a 2
TNP-ATP	trinitrofenolový analog ATP (29,39- <i>O</i> -(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP)
UDP	uridin-5'difosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
YO-PRO-1	označení organického barviva YO-PRO-1

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Purinergní signalizace a extracelulární ATP.....	2
2.1.	Uvolňování ATP do extracelulárního prostoru	2
2.2.	Purinergní receptory	3
2.2.1.	Adenosinové P1 receptory.....	3
2.2.2.	Metabotropní P2Y receptory	4
2.2.3.	Ionotropní P2X receptory	4
2.2.4.	Farmakologické vlastnosti a mezidruhové rozdíly P2X7 receptoru.....	8
2.3.	Ektonukleázy	10
3.	P2X7 receptor v imunitním systému.....	12
3.1.	ATP, purinergní receptory a chemotaxe zánětlivých buněk.....	13
3.2.	NLRP3 inflamazom.....	14
4.	P2X7 receptor v gliových buňkách nervového systému.....	16
4.1.	Neurodegenerativní poruchy	17
4.2.	Neuropatická bolest	19
4.3.	Deprese	20
5.	Závěr	21
6.	Použitá literatura	23

1. Úvod

Adenosin-5'-trifosfát (ATP) je multifunkční molekula, která je v buňce hlavním energetickým oběživem a jedním z pěti nukleotidů potřebných pro syntézu nukleových kyselin. Mimo buňku má roli signalizační molekuly. Jako zdroj buněčné energie byl ATP objeven v roce 1929. V dalších letech se vědci věnovali výzkumu struktury molekuly ATP, která byla odhalena roku 1945, a dále studovali jeho roli uvnitř buňky. Změna nastala v roce 1962, kdy se Geoffrey Burnstock rozhodl objasnit svá pozorování, při kterých našel v periférii neuronální signalizaci, která se obejde bez acetylcholinu a noradrenalinu, klasických neurotransmiterů. Na podnět dat od Pamelý Holton z roku 1959, která ukázala schopnost senzorických nervů uvolňovat ATP, začal zkoumat možnost přenosu signálů mezi motorickými nervy a svalovinou pomocí ATP. Roku 1972 prokázal existenci nervů, které jako neuropřenašeč užívají ATP. Bohužel jeho objevu mnozí nevěřili. Zdálo se nepravděpodobné, že by ATP mohlo mít ještě jinou roli než jako univerzální zdroj buněčné energie, kromě toho, pro extracelulární ATP nebyl znám žádný receptor. Na základě výzkumů vědců, kteří jeho nálezu věřili a studovali dál, přišel Burnstock roku 1978 s hypotézou o existenci purinergních P2 receptorů pro ATP. Navrhl je oddělit od receptorů pro adenosin (koncový produkt metabolismu ATP), které nazval P1. V dalších výzkumech byly P2 receptory rozčleněny podle různého buněčného efektu do dvou podskupin. Rozvoj molekulárních technik v 90. letech vedl k objevu genů pro P2X a P2Y receptory (jak shrnuto v Khakh a Burnstock, 2009). U savců jsou známy čtyři P1 receptorové podtypy (A1, A2A, A2B a A3), osm metabotropních P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) a sedm ionotropních P2X (P2X1–7) receptorů (jak shrnuto v Burnstock, 2006a; Khakh a Burnstock, 2009).

Extracelulární ATP a adenosin, který je jeho hlavním metabolitem, se velmi významně podílejí na zprostředkování imunitní odpovědi. Adenosin je imunosupresorová molekula, ale zda bude ATP působit jako inhibitor nebo stimulátor imunitní odpovědi, závisí na jeho koncentraci. V podstatě na všech imunitních buňkách jsou P1 a P2 receptory exprimovány, a tak jsou zapojeny do mnoha imunitních dějů i zánětu. Tato vlastnost purinergních receptorů je staví do středu zájmu o výzkum a navrhování nových farmak a léků, které mohou ovlivnit funkci těchto receptorů, a které by případně mohly mít význam pro léčbu chronických zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění. V této práci se pokusím shrnout nejnovější a nejdůležitější poznatky o purinergní signalizaci v této oblasti.

2. Purinergní signalizace a extracelulární ATP

ATP se nalézá ve všech živých buňkách, jejich organelách i v sekrečních váčcích, kde slouží jako důležitý zdroj energie. Když vědci přišli s myšlenkou, že ATP má také roli signalizační molekuly a buňky jej uvolňují do extracelulárního prostoru, setkali se s odpůrci. Ti tvrdili, že se buňka nebude dobrovolně zbavovat tak důležité intracelulární molekuly, jakou je ATP, a že molekula takových rozměrů nemůže procházet přes plazmatickou membránu prostou difuzí. Účinky purinů v extracelulárním prostředí byly proto dlouho přisuzovány adenosinu, adenosin-5'-difosfátu (ADP) a adenosin-5'-monofosfátu (Elliott a spol., 2009.), což jsou degradační produkty ATP. Pozdější výzkumy dokázaly, že se ATP opravdu nalézá i v extracelulárním prostoru, kde slouží jako neuropřenašeč nebo mezibuněčná signalizační molekula (jak shrnuto v Burnstock, 2006a). Extracelulární ATP se účastní mnoha základních buněčných procesů např. buněčné regenerace, proliferace, diferenciací a buněčné smrti. Do extracelulárního prostředí není uvolňován pouze poškozenými nebo umírajícími buňkami, jak se dříve předpokládalo, ale i fyziologicky jako reakce na některé změny fyziologického stavu buňky, osmotického tlaku či na přítomnost určitých látek v mimobuněčném prostředí (jak shrnuto v Burnstock, 2006b; Tu a Wang, 2009).

2.1. Uvolňování ATP do extracelulárního prostoru

ATP se umí chovat jako neurotransmitter, a proto se jeho sekrece v mnohém neurotransmitterům podobá. V nervových buňkách se nachází v zásobních granulích, volně v cytoplazmě či v různých typech váčků (synaptické, sekreční) společně s dalšími typy přenašečů. ATP se může z buňky uvolňovat exocytózou, při které dochází vlivem akčního potenciálu a následným zvýšením permeability pro Ca^{2+} a jeho vstupu dovnitř buňky ke splynutí membrány váčku s plazmatickou membránou. To je následováno vyjitím obsahu váčku včetně ATP do extracelulárního prostoru. Váčky se po vyprázdnění vrací zpět do cytoplazmy mechanismem endocytózy (jak shrnuto v Bodin a Burnstock, 2001). Další možností jak uvolnit ATP do extracelulárního prostoru je metoda „kiss and run“, ke které dochází při vysokých hodnotách intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Váček se k membráně pouze připojí, mezi membránou váčku i membránou buňky se utvoří dočasný pór, kterým látka projde ven, a poté se váček od membrány znovu odpojí a putuje zpět do cytoplazmy (jak shrnuto v Fesce a Meldolesi, 1999; Tvrdoňová, 2008).

Rozdíl v množství ATP mezi cytoplazmou (několik milimolů) a extracelulárním prostředím (pouze nanomoly) je důvodem velkého intra/extracelulárního koncentračního

gradientu, který po otevření velkých pórů urychluje difuzní uvolňování ATP (G. Burnstock, 2007). Takto může být ATP uvolňováno do vodného extracelulárního prostředí přes panexinové, konexinové a nebo P2X7 receptorové kanály, které se nacházejí v neexcitabilních buňkách, které tvoří akční potenciály, včetně buněk imunitního systému (jak shrnuto v Lazarowski, 2012).

Přeměnou jiných nukleotidů může ATP v extracelulárním prostoru také vznikat, ale takto vzniklé množství je tak malé, že se na mezibuněčné signalizaci významně neprojeví (Jiang a spol., 2000a).

2.2. Purinergní receptory

Purinergní receptory lze rozdělit do dvou podskupin, P1 a P2. Jedná se o receptory, které jsou aktivovány extracelulárními nukleotidy, nejčastěji ATP a UTP, a produkty jejich degradace, kterými jsou ADP, UDP a adenosin (jak shrnuto v Burnstock, 2004). Navázáním některé této aktivační molekuly dochází kromě aktivace receptoru většinou i ke zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} (Dulon a spol., 1991).

2.2.1. Adenosinové P1 receptory

P1, neboli adenosinové receptory, patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Jsou tvořeny sedmi transmembránovými doménami. NH_2 konec (N-konec) se nachází vně buňky a COOH konec (C-konec) je směřován do intracelulárního prostředí.

Byly nalezeny 4 podjednotky P1 receptorů: A1, A2A, A2B a A3. Každý z receptorů má své specifické farmakologické vlastnosti, liší se agonisty, antagonisty a intracelulárními signalizačními mechanismy, které jsou shrnuty v Tabulce 1. Jsou přítomné v nervovém systému a svojí funkcí například ovlivňují uvolňování neurotransmiteru. Proto jsou cíleným místem v léčbě mnohých neurologických onemocnění od Parkinsonovy choroby až po mrtvici (Hernan a spol., 2002). A2A receptor nachází uplatnění také při zánětu a účastní se i některých kardiovaskulárních dějů jako je např. regulace spotřeby kyslíku myokardem a koronární průtok krve. Činnost těchto receptorů je inhibována např. kofeinem a teofylinem, které patří mezi methylxantiny (jak shrnuto v Piirainen a spol., 2011).

2.2.2. Metabotropní P2Y receptory

Purinergní P2Y receptory jsou také spřažené s G-proteiny a mají sedm transmembránových domén. Proteiny P2Y jsou tvořeny z 328 – 377 aminokyselin. Dnes je známo 8 savčích P2Y podtypů: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 a P2Y14. Jednotlivé podtypy se od sebe liší výskytem (jak shrnuto v Fischer a Krugel, 2007) a svými fyziologickými a farmakologickými vlastnostmi, které jsou shrnuty v Tabulce 1. Jednou z odlišných vlastností je jejich citlivost k nukleotidům. P2Y1,11,12 a 13 jsou citlivé k adeninovým nukleotidům ATP/ADP, P2Y2, 4 a 6 mají citlivost pro uracilové nukleotidy UTP/UDP, P2Y14 je citlivý na UDP-glukózu, u receptoru P2Y2 se může projevit citlivost na adeninové i uracilové nukleotidy.

Díky vazbě na různé G-proteiny aktivují tyto receptory různé buněčné děje. P2Y11 zprostředkovává pomocí G_s stimulaci adenylátcyklázy, naproti tomu P2Y12, 13, 14 inhibují adenylátcyklázu pomocí G_i/G_o signální transdukční dráhy. Receptory P2Y1, 2, 4, 6, 11, které jsou spřaženy s proteiny $G_q/11$, aktivují fosfolipázu C, tvorbu inositoltrifosfátu a uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob (jak shrnuto v von Kugelgen a Wetter, 2000).

2.2.3. Ionotropní P2X receptory

Purinergní P2X receptory jsou iontové kanály, které propouštějí Na^+ a Ca^{2+} nebo i větší organické kationty, a jejichž otevření způsobí navázání extracelulárního ATP. Tato skupina receptorů se dělí do sedmi podjednotek, které jsou kódovány různými geny. Některé geny jsou lokalizovány na stejném chromozomu, a předpokládá se, že vznikly genovou duplikací, např. geny pro P2X4 a P2X7 jsou na chromozomu 12 u vrcholu jeho dlouhého ramene (Buell a spol., 1997). Geny pro P2X1 a P2X5 také sdílí společný chromozom a tím je chromozom 13. Geny ostatních podjednotek leží na odlišných chromozomech (Urano a spol., 1997).

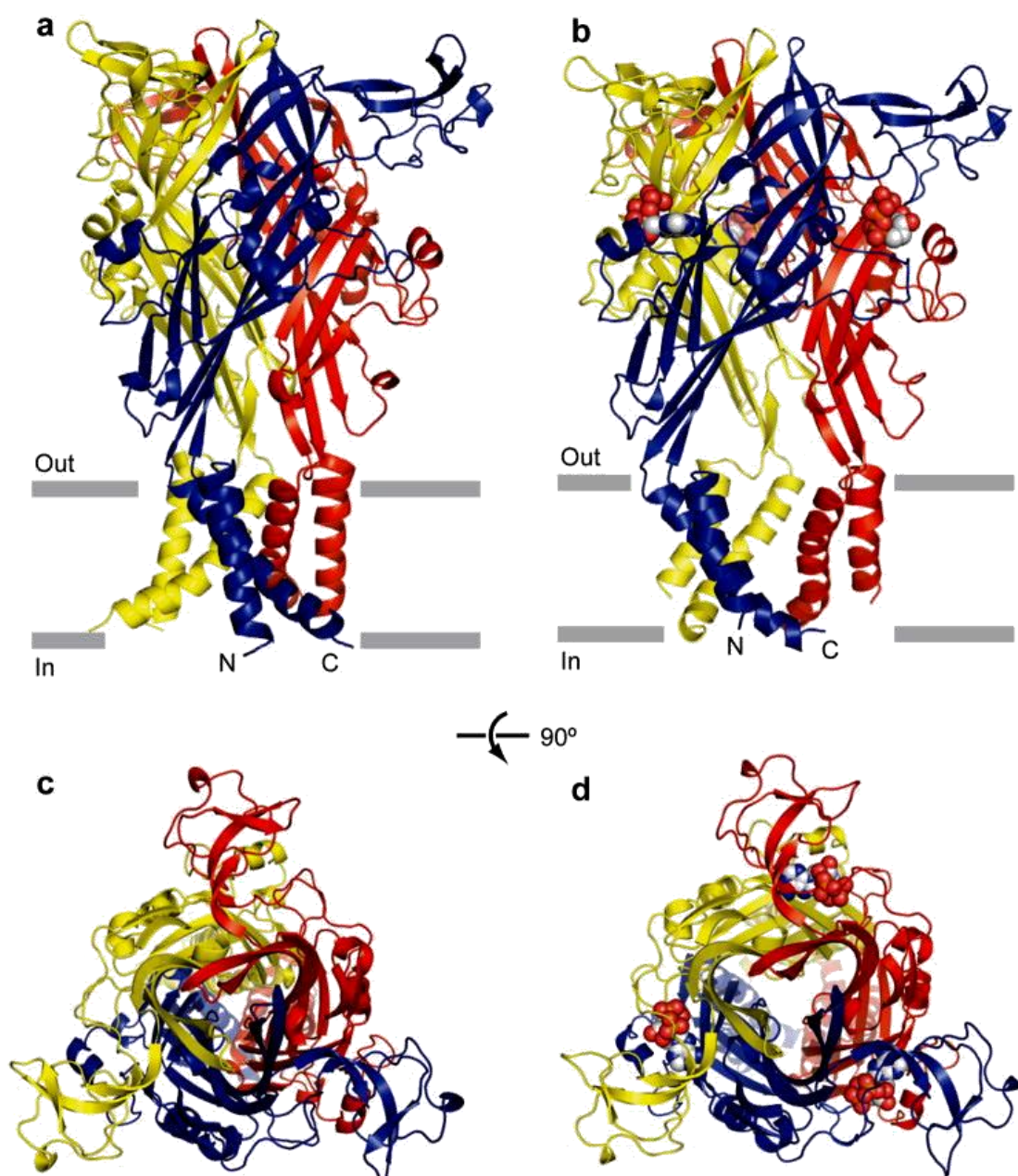
Podjednotky P2X receptorů mají různý počet aminokyselin. Nejdelší je P2X7 receptor s 595 aminokyselinami. Každý receptor je složen ze dvou hydrofobních částí, které procházejí plazmatickou membránou. První transmembránová oblast (TM1) začíná kolem zbytku s číslem 30 a druhá (TM2) až kolem 320 (Valera S., 1994; jak shrnuto v North, 1996a). Obě transmembránové domény mají asi 20 aminokyselin ve tvaru šroubovice. TM2 tvoří stěnu póru iontového kanálu aktivovaného P2X receptoru.

N- i C-konce se nacházejí v cytoplazmě (jak shrnuto v North, 1996b). Mezi TM1 a TM2 je rozsáhlá extracelulární smyčka s deseti cysteinovými zbytky. Cysteiny mezi sebou pojí

dvojné vazby, které přispívají k utvoření terciární struktury P2X receptorů (Ennion a Evans, 2002). Extracelulární smyčka obsahuje vazebné místo pro ATP (Obr. 1) (Hattori a Gouaux, 2012).

P2X receptory se skládají ze tří podjednotek. Mohou tak vznikat homomerní receptory, které jsou tvořeny pouze jedním typem podjednotek, nebo heteromerní receptory, které jsou složeny z různých druhů podjednotek. Například P2X2 – P2X3, P2X1 – P2X4, P2X4 – P2X6 a P2X1 – P2X6 umí vytvořit heteromerní uskupení. Receptor P2X7 je schopen tvořit pouze homomerní kanály (Torres a spol., 1999).

Ke změně stavu P2X receptoru je potřeba navázání ATP, které působí různé konformační změny jako je například přechod z uzavřeného do otevřeného stavu kanálu (Obr. 1), z otevřeného do desensitizovaného nebo z otevřeného do dilatovaného stavu. Různé podtypy P2X receptorů jsou na přítomnost ATP různě citlivé, což ovlivňuje i rychlost změny jejich stavu (jak shrnuto v Vial a spol., 2004). ATP aktivuje P2X7 receptor až v koncentraci větší než 100 μM , zatímco ostatní P2X receptory aktivuje v rozmezí koncentrací od 0,5-30 μM (jak shrnuto v Junger, 2011). Liší se také citlivostí k jiným agonistům, antagonistům a alosterickým modulátorům (jak shrnuto v Coddou a spol., 2011). Nejdůležitější rozdíly mezi P2X receptory jsou uvedeny v Tabulce 1.



Obrázek č. 1: **Krystalová struktura P2X4 receptoru z rybký zebřičky (zf-P2X4).**

Části (a) a (c) ukazují receptor v uzavřeném stavu, (b) a (d) ve stavu otevřeném. Jsou zde barevně vyznačené tři podjednotky. Boční pohled, (a) a (b), naznačuje uložení receptoru v plazmatické membráně, kde „out“ označuje vnější povrch membrány a „in“ její cytoplazmatickou část. Po otočení o 90° je vidět uzavřený (c) a otevřený (d) stav receptoru z pohledu kolmo k membráně. Molekula ATP, která vyvolává konformační změny je znázorněna v části (b) a (d) v ATP vazebném místě. Převzato z (Hattori a Gouaux, 2012)

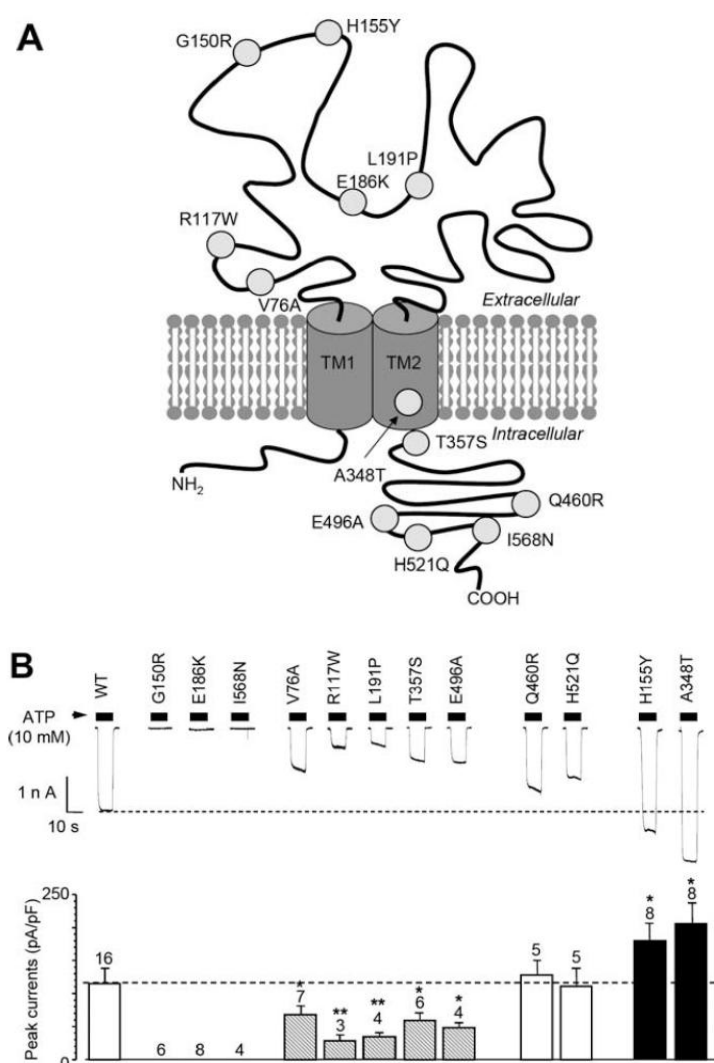
Tabulka 1: Charakteristiky purinergních P1 a P2 receptorů

Souhrn nejdůležitějších míst výskytu, agonistů, antagonistů a transdukčních mechanismů u jednotlivých podtypů P1 a P2 receptorů. Nejdůležitější zkratky jsou vysvětleny v textu práce, ostatní jsou popsány ve článku (Burnstock, 2006a), odkud je tabulka převzata a přepracována.

Receptor	Hlavní distribuce	Agonisté	Antagonisté	Transdukční mechanismy
P1				
A1	Mozek, spinální mícha, varle, srdce, autonomní nervová zakončení	CCPA, CPA	DPCPX, N0840, MRS1754	G ₁₁ , G _{12a} G ₁₃ , ↓cAMP
A2A	Mozek, srdce, plíce, slezina, imunitní buňky	CGS21680	KF17837, SCH58261	G _s , ↑cAMP
A2B	Tlusté střevo, močový měchýř	NECA (neselektivní)	Enprofylline, MRE2029F20	G _s , ↑cAMP
A3	Plíce, játra, mozek, varle, srdce	IB-MECA, CI-IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L268605, MRS1191	G ₁₂ , G _{13a} G _{q/11} , ↓cAMP, ↑Ins(1, 4,5)P ₃
P2Y				
P2Y1	Epiteliální a endoteliální buňky, krevní destičky, imunitní buňky, osteoklasty	2-meSADP > 2-meSATP = ADP > ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500	G _q /G ₁₁ ; PLC-β aktivace
P2Y2	Imunitní buňky, epitheliální a endoteliální buňky, ledvinové kanálky, osteoblasty	UTP Z ATP, UTPγS, INS37217	Suramin> RB2, ARC126313	G _q /G _{11a} případněG _i ; PLC-β aktivace
P2Y4	Endoteliální buňky	UTP ≥ ATP, UTPγS	RB2 >slamin	G _q /G ₁₁ a případně G _i ; PLC-β aktivace
P2Y6	Některé epitheliální buňky, placenta, T buňky, brzlík	UDP > UTP >> ATP, UDPβS	MRS2578	G _q /G ₁₁ ; PLC-β aktivace
P2Y11	Slezina, střevo, granulocyty	ARC67085 >BzATP ≥ ATPγS> ATP	Suramin> RB2, NF157	G _q /G ₁₁ a G _s ; PLC-β aktivace
P2Y12	Krevní destičky, gliové buňky	2-MeSADP ≥ ADP >> ATP	CT50547, ARC69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413	G _i (G ₀); inhibice adenynylcyclázy
P2Y13	Slezina, mozek, lymfatické uzliny, kostní dřeň	ADP = 2-meSADP>> ATP a 2-meSATP	MRS2211	G _i /G ₀
P2Y14	Placenta, tuková tkáň, žaludek, střevo, přerušované oblasti mozku	UDP glukóza = UDP-galaktóza	-	G _q /G ₁₁
P2X				
P2X1	Hladké svalstvo, krevní destičky, mozeček, zadní roh míšních neuronů	α, β-meATP = ATP = 2-meSATP (rychlé znečistlivění)	TNP-ATP, IP ₃ I, NF023, NF449	Kationový kanál (Ca ²⁺ a Na ⁺)
P2X2	Hladké svalstvo, CNS, sítnice, chromafinní buňky, autonomní a senzorická ganglia	ATP ≥ ATPγS ≥ 2-meSATP>> α, β-meATP (pH a zinková citlivost)	Suramin, iso- PPADS, RB2, NF770	Iontový kanál (zejména Ca ²⁺)
P2X3	Senzorické neurony, nucleus tractus solitarii, některé sympatické neurony	2-MeSATP ≥ ATP ≥ α, β-meATP ≥	TNP-ATP, PPADS	Kationová kanál
P2X4	CNS, glie, buňky imunitního systému, varle, tračník	Ap ₄ A (rychlé znečistlivění) ATP>>α, β-meATP, CTP	A317491, NF110	Iontový kanál (zejména Ca ²⁺)
P2X5	Proliferující kožní buňky, střevo, močový měchýř, brzlík, spinální mícha	ATP >> α, β-meATP, ATPγS	TNP-ATP (slabý), BBG (slabý)	Iontový kanál
P2X6	CNS, motorické neurony ve spinální míše	–(nefunguje jako homomultimer)	Suramin, PPADS, BBG	Iontový kanál
P2X7	Apoptické buňky např. imunitní buňky, gliové buňky astrocyty, slinivky břišní, kůže	BzATP>ATP ≥ 2-meSATP>> α, β-meATP	-	Iontový kanál
			KN62, KN04, MRS2427, Coomassiebrilliant blue G	Iontový kanál s velkým pórem

2.2.4. Farmakologické vlastnosti a mezidruhové rozdíly P2X7 receptoru

P2X7 receptor byl naklonován až jako poslední z rodiny P2X receptorů v devadesátých letech minulého století (Surprenant a spol., 1996). Gen pro lidský P2X7 receptor obsahuje 13 exonů. Nachází se na 12. chromozomu v oblasti 12q24,31 (Buell a spol., 1997), která je spojena s bipolárními afektivními poruchami (Barden a spol., 2006). Gen pro P2X7 receptor má velké množství polymorfizmů (SNP), které mají vliv na lidské zdraví. Jedná se např. o různé náchylnosti k poruchám nálady (Stokes a spol., 2010) nebo regulaci chronické bolesti (Sorge a spol., 2012), viz Obrázek č. 2.



Obrázek č. 2: SNP pojované s poruchami nálad.

A) Umístění 12 jednobodových mutací (SNP) v genu pro P2X7 receptor, které jsou spojovány s poruchami nálad. Většina mutací je umístěna na C-konci a extracelulární smyčce. Na N-konci se nenachází žádná mutace. B) Porovnání chování jednotlivých mutací při proudech vyvolaných 10 mM

ATP (horní část) a průměrná hodnota maximálních amplitud těchto proudů měřených v extracelulárním solném roztoku s normální hladinou vápníku. Změna chování byla vždy porovnána s kontrolním vzorkem a je vidět, že jednotlivé mutace reagují odlišným způsobem. Převzato a přepracováno z (Roger a spol., 2010).

P2X7 receptor má podobně jako ostatní P2X receptory své specifické agonisty a antagonisty. Agonista je činitel, který působí stejně nebo podobně jako ATP, antagonist má opačný účinek. Nejznámějším agonistou P2X7 receptoru je 2',3'-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP), který aktivuje i jiné P2X receptory, ne ale tak silně jako právě P2X7 receptor (Bianchi a spol., 1999). U P2X7 receptoru je BzATP 10 – 30 krát silnějším agonistou než ATP. Dojde-li k odstranění vápníku a/nebo hořčíku z extracelulárního prostředí, pak nastane zesílení aktivačního efektu ATP a BzATP na P2X7 receptor (Surprenant a spol., 1996). Odlišná citlivost k BzATP se neprojevuje jen u různých podtypů P2X receptorů, ale liší se i u P2X7 různých živočišných druhů, např. u potkanů je odpověď na BzATP silnější než u lidského podtypu P2X7 receptoru. Podobně jako u ostatních P2X podtypů, pór iontového kanálu je tvořen především TM2 oblastmi (Jindrichova a spol., 2015). Velmi slabými agonisty jsou ADP a AMP. Bylo prokázáno, že pokud je P2X7 receptor vystaven krátké počáteční aktivaci ATP nebo BzATP, tak dojde ke změně kanálových vlastností či vazebné domény pro agonisty nebo k obojímu, a receptor se poté stane citlivější pro ADP a AMP. Agonistický účinek ADP a AMP bude vnímán jako silnější, ale stále nikoli tak silný jako u samotného ATP. Tato možnost zesílení citlivosti receptoru nebyla prokázána u UTP ani adenosinu, které nejsou agonisty P2X7 receptoru. Možnost takto zesilovat vnímání vlivu ADP a AMP nefunguje u všech P2X receptorů, např. u P2X2 nebyla prokázána. Pokud je prodloužena nebo opakována aplikace ADP a AMP, nedojde ani k dilataci póru jako je tomu u BzATP nebo ATP. ATP, stejně jako ADP a AMP, před jejichž působením byl P2X7 receptor aktivován ATP, vyvolávají uvolňování interleukinu-1 β (Chakfe a spol., 2002).

Oxidované ATP je antagonist, který nevratně inhibuje P2X7 receptor v koncentraci 100 μ M (Murgia a spol., 1993; jak shrnuto v Surprenant a spol., 1996). Dalším antagonistou je Brilliant Blue G (BBG), který je více efektivní v potkaních P2X7 receptorech než v lidských (Jiang a spol., 2000b). Pyridoxalfosfát-6azofenil-2',4'-disulfonát (PPADS) a suramin jsou antagonisté, kteří jsou v lidských P2X7 receptorech více účinní než v potkaních (Surprenant a spol., 1996). Více než suramin je efektivní jeho analog NF279 (Klapperstück a spol., 2000). Další skupinou inhibitorů jsou protony a dvojmocné ionty, jako např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} , ze kterých je nejsilnějším inhibitorem měď, která působí již při koncentraci 0,5 – 3 μ M. Na

opačné straně stojí vápník, kterého musí být 2 – 3 mM. Při vymývání inhibice zmizí během několika málo minut. Kalmidazolium je další P2X7 receptorový blokátor. Tato látka po vnějším podání inhibuje proudy vyvolané BzATP (Virginio a spol., 1997). Následující skupina antagonistů je tvořena látkami KN-62 a KN-04, které jsou řazeny mezi izoquinoliny. Jejich vlivem dochází k inhibici BzATP proudů v lidských embryonálních ledvinných buňkách z linie č. 293 (HEK293), které po transfekci exprimují lidský P2X7 receptor. K inhibici nedochází u potkaních P2X7 receptorů. Dokáží také inhibovat vtoky Ca^{2+} , které jsou řízené ATP v některých leukocytárních buněčných typech se schopností exprimovat myši nebo lidskou P2X7 receptorovou mRNA (Humphreys a spol., 1998). Velmi hezky ukazuje rozdíl v potřebném množství pro inhibici jednotlivých P2X receptorů trinitrofenylový analog ATP (TNP-ATP), kterého je na inhibici P2X7 receptoru potřeba více než 30 μM , menší množství je třeba na inhibici P2X4 a P2X2, na které ale také působí velmi slabě, zatímco inhibice P2X1, P2X3 a P2X2/3 vyžaduje jen nízké nanomolární koncentrace (Virginio a spol., 1998).

Vlivem dlouhodobého působení agonistů se P2X7 receptorový pór stává propustnější pro velké organické molekuly jako na např. N-methyl-D-glukamin (NMDG) (Virginio a spol., 1999; Kukulski a spol., 2005;). Dalším charakteristickým rysem P2X7 receptoru je schopnost vstřebávat fluorescenční barviva. Jde především o barvivo YO-PRO-1 a ethidium bromid. Některé studie dokazují, že YO-PRO-1 a jiná kationová barviva mají společné dráhy propustnosti s NMDG. Iontové proudy nesené P2X7 receptorem i YO-PRO-1 akumulace jsou vratné při krátké aplikaci agonisty (Virginio a spol., 1999). Jak bylo již výše řečeno, kalmidazolium má blokační vliv na P2X7 receptory, ale neovlivňuje kinetiku nebo amplitudu vstřebávání YO-PRO-1, které bylo indukováno BzATP (Virginio a spol., 1997). Předpokládá se, že k otevření velkého póru P2X7 receptoru nestačí jeho TM domény, ale jsou potřeba další transmembránové molekuly, například hemikanál panexin-1 (Pelegrin a Surprenant, 2006).

2.3. Ektonukleázy

Ve vodném extracelulárním prostředí je účinek extracelulárních nukleotidů, mezi které patří kromě ATP také ADP, UTP, UDP a diadenosinpolyfosfát, inaktivován baterií silných nukleotidáz (jak shrnuto v Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2014). Ektonukleotidázy degradují nukleotidy mechanismem hydrolýzy a dělí se na pět podskupin: NTPDázy, NPPázy, ALPázy, ACPázy a ekto-5'-nukleotidázy.

Ekto-nukleosid trifosfátdifosfohydrolázová rodina (E-NTPDázy) neboli nukleositrifosfátdifosfohydrolázy (NTPDázy) obsahují 8 členů. Jednotlivé typy jsou různě

lokalizovány. NTPDázy 1, 2, 3 a 8 jsou lokalizovány na buněčném povrchu. V extracelulárních organelách se nacházejí NTPDázy 4 a 7, které se na rozdíl od ostatních členů nejspíš nepodílí na hydrolýze extracelulárních nukleotidů. Členové 5 a 6 se nachází na buněčném povrchu, nebo jsou v extracelulárním prostředí v podobě exoenzymů (jak shrnuto v Zimmermann, 2001). Aby proběhla hydrolýza, jsou potřeba specifické podmínky např. pH 7 – 8,5 a přítomnost Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů (jak shrnuto v Yegutkin, 2014).

Nukleotid pyrofosfatázy/fosfodiesterázy (NPPázy) jsou tvořeny sedmi členy (NPP1 – 7). Ne všichni členové se ale účastní hydrolýzy nukleotidů. Na té se podílí jen NPP1, NPP2, NPP3, které mají nukleotidové substráty: ATP, ADP a diadenosintrifosfát (Ap_nA). NPP2 má ještě další substrát, kterým je lysofosfatidylcholin, čímž se podobá NPP6 a NPP7, které se hydrolýzy nukleotidů neúčastní. Dalším substrátem NPP6 je glycerofosforylcholine a u NPP7 je jím somatostatin. Substrátová specifita pro NPP4 a NPP5 zatím není známa (Sakagami a spol., 2005; jak shrnuto v Stefan a spol., 2006). Stejně jako NTPDázy potřebují i NPP1 – 3 ke své aktivitě optimální prostředí, kterým je alkalické pH a přítomnost dvojmocných iontů jako je Zn^{2+} a Mg^{2+} (Gijssbers a spol., 2001).

ALP (alkalické fosfatázy) u lidí obsahují čtyři členy: ALPL, ALPP, ALPP2 a ALP1 u myši se nachází akp2, akp3 a akp5. Pokud jsou přítomny ionty Zn^{2+} a Mg^{2+} , tak může ALP ovlivňovat velké množství substrátů a hydrolýzou nukleotidů může působit na aktivitu P2 receptorů (jak shrnuto v Yegutkin, 2014).

ACP (kyselé fosfatázy) jsou tvořeny pěti členy, z nichž jen člen OcAP/TrAP může působit hydrolýzu ATP a ADP. Proto by mohl působit na P2 receptory např. v kostech, kde je lokalizován (jak shrnuto v Hayman, 2008; Kaunitz a Yamaguchi, 2008).

Ekto-5'-nukleotidáza (CD73) vytváří z AMP adenosin a způsobuje tak aktivaci P1 receptorů. CD73 se vyskytuje v mnoha orgánech, ale jedna z jejích nejdůležitějších funkcí je stimulace vývoje rakoviny prsu. Této znalosti se dá využít při tzv. anti-CD73 protilátkové terapii (Stagg a spol., 2010).

3. P2X7 receptor v imunitním systému

P2X7 receptory se vyskytují u mnoha typů buněk imunitního systému, především jde o buňky hematopoetického původu. Jsou k nalezení na granulocytech (eozinofily, bazofily a neutrofilny), monocyttech a T a B lymfocytech (Collo a spol., 1997). Dalšími buňkami, na kterých se vyskytují P2X7 receptory, jsou žírné buňky, makrofágy, dendritické buňky (DC) a NK buňky (jak shrnuto v North, 2002; Di Virgilio a Vuerich, 2015;). Stručný popis jednotlivých typů buněk je uveden v Boxu č. 1.

- **Neutrofilní a eozinofilní granulocyty** (tzv. neutrofilny a eozinofily) jsou buňky, které se řadí mezi profesionální fagocyty. Jsou to buňky nespecifické imunity, které se účastní zánětlivé reakce a alergických reakcí. Neutrofilní granulocyty ničí opsonizované bakterie a eozinofilní granulocyty se účastní boje proti mnohobuněčným patogenům.
- **Bazofilní granulocyty** (tzv. bazofily) jsou příbuzní s žírnými buňkami. Jejich diferenciaci probíhá v kostní dřeni a spolu s žírnými buňkami se podílí na vzniku anafylaktického šoku.
- Mezi profesionální fagocyty se řadí i **monocyty**, což jsou buňky vznikající v kostní dřeni a nacházející se v krvi. Jsou prekurzorem makrofágů, což je jejich tkáňová forma.
- **Makrofágy** jsou buňky myeloidní linie, jejichž hlavní funkcí je fagocytóza a jsou tak zapojeny do množství imunitních dějů např. zánětlivé reakce, likvidace vlastních odumřelých buněk či prezentace antigenu T lymfocytů.
- **Dendritické buňky** (DC) jsou buňky prezentující antigen, APC. Existují ve dvou formách: nezralé a zralé. Nezralá forma se vyskytuje ve tkáních, které jsou na rozmezí organismu a vnějšího prostředí např. kůže, sliznice dýchacího a zažívacího systému. Pokud není v těle infekce, tak nezralé DC likvidují odumřelé buňky zdravých tkání, ale jakmile identifikují nějaký faktor ohrožující organismus, tak se změni na zralou formu, která aktivuje T lymfocyty a poté u nich dojde k apoptóze.
- **T lymfocyty** jsou buňky vznikající z lymfoidní linie. Jejich vývoj probíhá v brzlíku (thymu), některé subpopulace se ale vyvíjí i mimo thymus. T lymfocyty se dělí do dvou skupin: Th což jsou tzv. pomocné T lymfocyty a Tc které se nazývají cytotoxické T buňky.
- Dalším produktem lymfoidní linie jsou **B lymfocyty**, které se vyvíjí v kostní dřeni a dokončují svůj vývoj po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Na konci vývoje B lymfocytů se nacházejí plazmatické buňky, které produkují protilátky. T i B lymfocyty jsou součástí antigenně specifické imunity a na svém povrchu vystavují specifické receptory (TCR, BCR).
- **NK-buňky** jsou buňky lymfoidní linie, které umí rozpoznat a zničit buňky, které na svém povrchu vystavují nenormálně malé množství MHC gp I, kterými jsou především některé viry a nádorové buňky.
- **Žírné buňky**, jejichž hlavní funkcí je sekretovat fyziologicky aktivní látky, díky kterým se uplatňují v boji proti parazitární infekci, mohou regulovat imunitní odpověď mezi imunitním a nervovým systémem, umí fagocytovat a prezentovat antigen, účastní se zánětu a účastní se zajišťování správného metabolismu pojivových tkání a zajištění fyziologických funkcí sliznic, ale také mají na svědomí vznik anafylaktického šoku, časného typu přecitlivělosti a formování a expanzi některých tumorů za patologických podmínek:

Box č. 1: **Stručný popis některých buněk imunitního systému** (zpracováno podle Hořejší a spol., 2013)

K tomu, aby imunitní systém spustil imunitní odpověď, musí dojít k rozeznání cizorodých nebo nebezpečných struktur, což způsobí aktivaci obranných mechanismů buněk

nespecifické imunity, mezi nimiž jsou i buňky prezentující antigen (APC buňky; např. dendritické buňky, monocyty a makrofágy), které zahájí procesy specifických obranných reakcí. Takovéto signály nebezpečí mohou pocházet z buněk, které jsou nějakým způsobem ve stresu. Signálů pro stav nebezpečí je mnoho, ale ve spojení s P2X7 receptorem je nejdůležitější ATP, který se za normálních okolností nachází uvnitř buňky, ale v případě nějakého stresového faktoru je buňkou uvolňován ven, kde plní roli signálu nebezpečí (jak shrnuto v Gallucci a Matzinger, 2001).

3.1. ATP, purinergní receptory a chemotaxe zánětlivých buněk

DAMP (damage-associated molecular pattern; molekulární vzor spojený s poškozením), neboli signál poškození nebo ohrožení, jsou primárně nukleotidy, nejčastěji ATP, který je po vstupu do extracelulárního prostředí hydrolyzován ektonukleotidázami na ADP, AMP a adenosin (viz kapitola 2.3. Ektonukleázy).

ATP uvolňovaný ze stresovaných buněk má pravděpodobně také schopnost působit jako chemotaktická molekula. V současné době je zkoumáno, zda ATP působí sám jako chemoatraktant nebo zda svojí činností podporuje v chemotaxi nějaké jiné molekuly (Elliott a spol., 2009; Chen a spol., 2006).

Chemotaxe je proces, při kterém dochází ke snímání chemického gradientu nějaké látky (mediátoru), která má nalákat organismus nebo buňky do místa potřeby např. imunitní buňky do místa zánětu. Dochází při ní ke snímání množství vylučované látky, polarizaci buňky a následné migraci buňky na místo určení. U apoptických buněk bylo zjištěno, že ATP a UTP fungují jako „find-me“ (najdi mě) signál, kterým jsou mobilizovány fagocyty (monocyty, DC a makrofágy), aby tyto buňky odklídily. Jako klíčový senzor find-me signálu byl charakterizován P2Y2 receptor, který je fagocytujícími buňkami exprimován. Zjištění role nukleotidů při tomto procesu, ale nevylučuje možnou účast jiných chemotaktických faktorů (Elliott a spol., 2009). ATP v případě neutrofilů působí zpětnou vazbou přes P2Y2 receptor jako signál orientační. P2Y2 snímá chemický gradient ATP a směřuje buňky do místa, odkud ATP vychází. Nepůsobí tedy jako signál ovlivňující přímo migraci buněk. Tento signál je zprostředkován adenosinem přes A3 receptor, který dohlíží na migrační rychlost neutrofilů do místa potřeby (Chen a spol., 2006). V případě sterilního zánětu (nejsou přítomny mikroorganismy) ATP také nebyla prokázána pravá chemotaktická aktivita. Adheze neutrofilů je způsobena mechanismy, díky nimž ATP dává impuls pro zahájení imunitní

zánětlivé odpovědi (McDonald a spol., 2010). Vzhledem k tomu, jak velké množství ATP musí být pro aktivaci P2X7 receptoru dodáno (viz kapitola *Ionotropní P2X receptory*), není P2X7 vhodným kandidátem na chemotaktický receptor, ale jeho nedostatek snižuje schopnost imunitních buněk dostat se na místo určení, např. nádoru, a ten tak není těmito buňkami infiltrován (Adinolfi a spol., 2015).

3.2. NLRP3 inflamazom

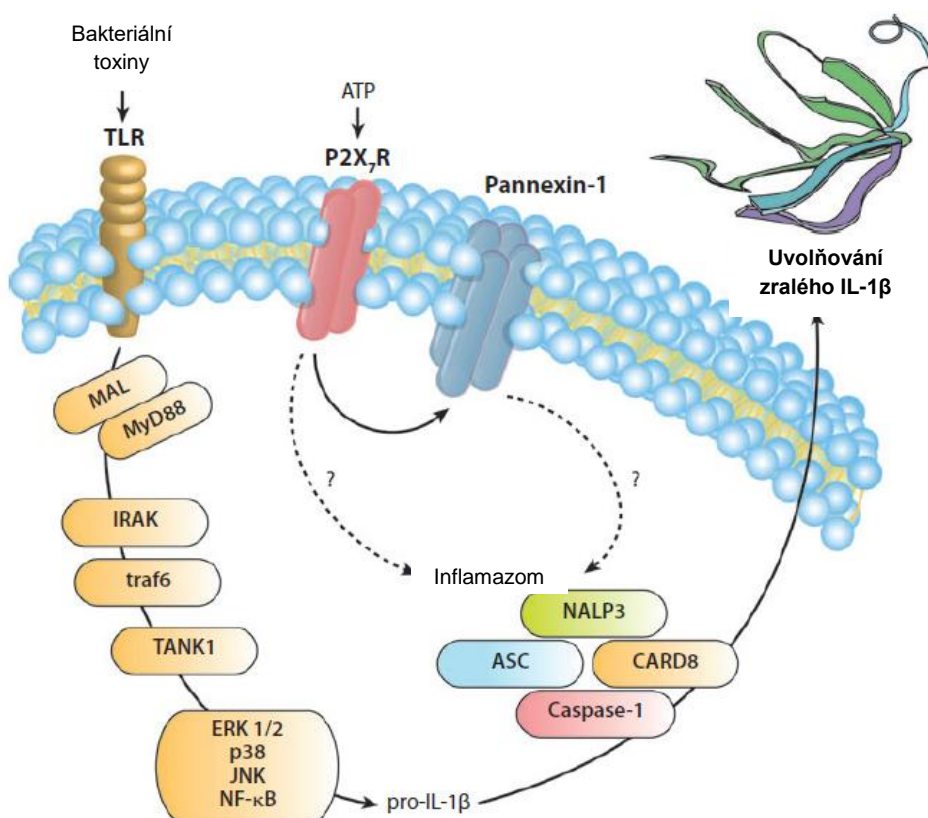
Ačkoli se P2X7 receptor pravděpodobně přímo neúčastní verbování imunitních buněk do místa potřeby, je jeho role v imunitním systému prokázána. Je velmi důležitý při zánětu a infekčních onemocněních, kde je součástí NLRP3 inflamazomu, proteinového komplexu, jehož hlavním cílem je tvorba zralého interleukinu 1 β (IL-1 β), náčrt tohoto komplexu je na obrázku č. 3.

Aby došlo ke zpracování a uvolnění IL-1 β , je nutné, aby imunitní buňky dostaly alespoň 2 různé stimuly. Jinak by se mohlo stát, že by imunitní systém mohl být použit např. proti organismům, které mu jsou prospěšné. Prvním velmi dobrým stimulem pro uvolňování IL-1 β je LPS (lipopolysacharid) a PAMPs (patogen-associated molecular patterns, molekulární vzor patogenu) (Lee a spol., 1993) a druhým stimulem je DAMP, např. ATP, toxin nigericin nebo snížená hladina intracelulárního K⁺, druhý signál je důležitý pro aktivaci kaspázy-1 a IL-1 β sekreci (Perregaux a Gabel, 1994). Signál ATP pro uvolňování IL-1 β je veden přes P2X7 receptor (Ferrari a spol., 1997). Zrání IL-1 β a jeho uvolňování je způsobeno kaspázou-1, což je cysteinová proteáza (Sanz a Di Virgilio, 2000; Thornberry a spol., 1992). Aktivací P2X7 receptoru vlivem ATP dochází ke snížení K⁺ v cytoplazmě buňky (Sanz a Di Virgilio, 2000). Výtok K⁺ je velmi důležitý pro zpracování a aktivaci kaspázy-1, která má poté vliv na vyšší sekreci IL-1 β (Cheneval a spol., 1998).

Aby vůbec mohlo dojít k příjmu PAMPs a zahájení kaskády, na jejímž konci je uvolnění IL-1 β , musí dojít k rozeznání molekulárních vzorů na nebezpečných částicích. To se děje pomocí PRR receptorů (pattern recognition receptor, receptory rozpoznávající vzory), mezi nimiž jsou nejvíce popsány Toll-like receptory (TLR) (jak shrnuto v Basset a spol., 2003). TLR receptorům jsou podobné NLR receptory (NOD-like receptory), které obsahují NOD doménu. Tyto receptory se dělí na dvě rodiny: NOD a NLRP, jejímž nejznámějším členem je NLRP3 protein, který je zapojený v inflamazomu. Kromě NOD domény obsahují také centrální nukleotidovou doménu NACHT a sérii LRR domén na C-koncové oblasti. LRR je

zapojena ve snímání ligandů. Důležitým adaptérem NLRP3 je ASC, která obsahuje CARD C-koncovou doménu. Pokud ASC chybí, nedochází k aktivaci kaspázy-1 a zrání IL-1 β (jak shrnuto v Martinon a spol., 2002).

Důležité je také upozornit na roli panexinu-1, který je silně exprimován v makrofázích a funguje jako hemikanál, který je stimulován LPS a je ve spojení s P2X7 receptorem. Bylo zjištěno, že při inhibici panexinu došlo k zablokování štěpení kaspázy-1 a nedošlo ke zpracování IL-1 β , k reakcím k nimž dochází po P2X7 receptorové aktivaci (Pelegriin a Surprenant, 2006).



Obrázek č. 3: **Úloha P2X7 receptoru v aktivaci NLRP3inflammasomu.** Toll-like receptory (TLRs) je skupina receptorů, která umí rozeznat různé patogenní faktory jako je například bakteriální toxin. Tyto receptory jsou na monocitech, makrofázích a mikroglíích, kde dochází k iniciaci kaskády klasického nukleárního faktoru (NF- κ B) a syntézy pro-interleukinu-1 β (pro-IL-1 β). ATP v místě zánětu vede k aktivaci P2X7 receptor/panexin-1 proteinového komplexu a současně nastává aktivace kaspázy-1 a následná formace NLRP3inflamazomu. Inflamazomu je proteinový komplex uvnitř stresovaných buněk, jeho součástí je i protein NLRP3 a kaspáza-1, která působí štěpení pro-IL-1 β . Následuje uvolnění zralých IL-1 β . Aktivace kaspázy-1 aktivací P2X7 receptoru/panexinu-1 není přesně popsána a známa, je možná specifická pro tkáň, buňky a stimuly. Převzato z (Surprenant a North, 2009).

Stručné vysvětlení ostatních zkratk z obrázku: MAL (MyD88 adaptor-like). MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) je adaptérový protein TLR pro aktivaci NF-κB. Jeho signální dráha jde přes IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase). Traf6 je člen rodiny proteinů TRAFs (TNF receptor associated factors) a součástí procesu přenosu signálu z TLRs. Další součástí této signální dráhy je TAK1 (trankynáza 1), ERK1/2 extracelulární signál regulující kinázy 1 a 2 (extracellular signal-regulated kinases), p38 (P38 mitogen-activated protein kinases) a JNK (c-Jun N-terminal kinases). ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) je nepostradatelnou součástí pro aktivaci kaspázy-1 v inflamazomu. CARD8 (Caspase recruitment domain-containing protein 8) je protein, který je při apoptóze či zánětu zapojen v aktivaci kaspáz nebo NF-κB.

Přestože je interleukin IL-1β zapojen do mnoha dějů probíhajících v těle, hlavní funkci hraje při zánětu, kde zprostředkovává imunitní odpověď organismu. Jeho vyšší množství však může působit patologicky. P2X7 receptor, který se účastní na produkci a uvolňování IL-1β je tedy důležitým cílem v léčbě mnoha imunitních onemocnění. Je dobře známo jeho zapojení při infekcích mikroorganismy např. u intracelulárních bakterií. Nejčastěji je uváděn ve spojení s *Mycobacterium tuberculosis* a *Chlamydia*. Hlavní cílovou buňkou těchto parazitů jsou makrofágy. Bakterie se v nich usadí a jsou uzavřeny do fagozomu, který by v normálním stavu provedl fúzi s lysozomem, jehož obsah by způsobil bakteriální smrt. Bakterie umí této fúzi bránit. Hostitelské buňky při napadení těmito patogeny dostanou zprávu o nebezpečí v podobě extracelulárního ATP. ATP se naváže na P2X7 receptor a následně dojde ke stimulaci fosfolipázy D, která dokáže spustit fagozom-lysozomální fúzi a navodit tak zničení parazita (Coutinho-Silva a spol., 2003).

4. P2X7 receptor v gliových buňkách nervového systému

Kromě toho, že se P2X7 receptory vyskytují na většině buněk vznikajících z hematopoetické linie, jsou také k nalezení na některých buňkách nervového systému. Jedná se především o mikroglie, ependymální buňky a astrocyty, které náleží do skupiny centrálních gliových buněk (Collo a spol., 1997; Sim a spol., 2004). Stručný popis jednotlivých gliových buněk je uveden v Boxu č. 2. V periferním nervovém systému jsou P2X7 receptory exprimovány Schwannovými buňkami (Zhang a spol., 2005). Jedná se o buňky, které nejsou nervového původu, které ale neurony podporují a zapojují se svou činností do chodu

centrálního nervového systému (CNS) i periferního nervového systému. Mikroglie jsou sice buňky nervového systému, ale jejich původ je hematopoetický. Pravděpodobně vznikají z makrofágů a mají také schopnost fagocytózy. Dokážou uvolňovat IL-1 β a hrají významnou roli v akutních i chronických neurodegeneracích (jak shrnuto v Allan a Rothwell, 2001). P2X7 na mikroglia umí po aktivaci ATP uvolňovat do okolí zánětlivé cytokiny jako je např. TNF- α . Mikroglie aktivované BzATP poskytují neuronům ochranu před vlivem glutamátu, který umí vyvolat jejich smrt. Tato ochrana je způsobena neuroprotektivními látkami uvolněnými z mikroglia (Suzuki a spol., 2004).

- **Neurony** Jsou základními stavebními jednotkami mozku. Z buněčného těla neuronů vycházejí dva typy výběžků: axony, které ze svých terminálů uvolňují neuropřenašeče a neuromodulátory, a dendrity, které na dendritických spinech přijímají neuropřenašečový signál z jiného neuronu. Tvoří složité komunikační dráhy, které tělu pomáhají řídit množství funkcí fyzických i psychických.
- **Gliové buňky:** Jde o podpůrné buňky, kterých je v nervové soustavě více než neuronů, a které neurony obklopují. Na rozdíl od neuronů netvoří axony. Gliové buňky obsahují několik buněčných druhů: mikroglie, ependymové buňky, astrocyty, oligodendrocyty, radiální (paprsčité) glie a jejich obdobou v periferním nervovém systému jsou Schwannovy buňky
- **Mikroglie** tyto buňky pravděpodobně vznikají z makrofágů, jimž se podobají strukturou i funkcí. Podílí se na odstraňování odumřelé nervové tkáně a tvorbě jizev.
- Vnitřní povrch mozkových komor je vystýlán **ependymovými buňkami**
- **Astrocyty** dělí se do dvou skupin: vláknité (v bílé hmotě mozkové) a protoplazmatické (v šedé hmotě mozkové). Tvoří kontakty s neurony a krevními cévkami.
- **Oligodendrocyty** tvoří myelin a vyskytují se hlavně v bílé hmotě mozkové.
- Výsledkem **činnosti Schwannových buněk** je myelin kolem axonů (myelinové pochvy), který může za rychlou vodivost nervových vzruchů.

Box č. 2: **Stručný popis některých buněk nervového systému.** (zpracováno podle Nicholls a spol., 2013).

4.1. Neurodegenerativní poruchy

Neurodegenerativní poruchy jsou poruchy, při kterých dochází k rozsáhlým neurologickým a psychickým problémům. Jsou způsobeny postupným odumíráním některých populací nervových buněk. Často se projevují ztrátou schopnosti správně ovládat pohyby těla a řeč. Z pohledu psychiky dochází především ke ztrátě paměti, ztrátě správného rozumového uvažování atd. Mezi neurodegenerativní onemocnění patří jedny z nejzávažnějších onemocnění dnešní populace např. Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD) a Huntingtonova choroba (HD). Tato onemocnění jsou zatím stále špatně léčitelná.

AD se projevuje poškozením paměti, dezorientací, ztrátou schopnosti o sebe samostatně pečovat atd. Amyloidní- β peptid (A β), který je přítomný v amyloidních plácích, jež se nalézají v mozku pacientů s AD, je toxický a vzniká z amyloidního prekurzorového proteinu

(Klapperstück a spol., 2000) štěpeného β - a γ - sekretázami. Štěpení APP pomocí α -sekretázy vede k vytvoření rozpustné APP ektodomény, která zamezí tvorbě toxického A β a má neuroprotektivní vlastnosti. Bylo zjištěno, že APP ektodoména je uvolňována po stimulaci P2X7 receptoru BzATP nebo ATP. K tomuto ději dochází na primárních astrocytech, neuroblastomových buňkách a nervových progenitorových buňkách (Delarasse a spol., 2011). P2X7 receptor se ve zvýšené míře nachází v okolí amyloidních plaků myšího transgenního modelu AD, kde byla také registrována přítomnost aktivovaných neuroglií a astrocytů (Parvathenani a spol., 2003). P2X7 receptor také hraje důležitou roli při A β vyvolaném uvolňování IL-1 β z mikrogliových buněk, protože u P2X7 deficientních myší nebylo toto uvolňování pozorováno. Dalšími účinky působení A β ve spojení s mikrogliemi a P2X7 receptorem je permeabilizace plazmatické membrány mikroglií, zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ a uvolňování ATP (Sanz a spol., 2009). Dalším zajímavým zjištěním o Alzheimerově nemoci ve spojení s P2X7 receptorem je nález, že se mutace C489T, jeden z polymorfismů P2X7, vyskytuje mnohem méně u lidí trpících touto nemocí než u lidí z věkově podobné kontrolní skupiny, kteří demenci netrpí (Sanz a spol., 2014).

Další velice závažnou chorobou je Huntingtonova choroba. Její příčinou je zmnožení tripletu CAG nad normální hodnotu 35 tripletů (Nicholls a spol., 2013). Tento triplet kóduje aminokyselinu, jež stojí za výrobou bílkoviny s názvem huntington. Dochází při ní k podobným problémům, jako u jiných neurodegenerativních nemocí, ale projevuje se již mezi 30. a 40. rokem, případně i dříve. Jedněmi z jejích charakteristických projevů, kromě poruch pohybových funkcí, jsou úbytek na váze a depresivní stavy. Ve spojení s P2X7 receptorem bylo zjištěno, že se větší počet tohoto receptoru nachází u myší s HD než u zdravých jedinců. Množství P2X7 nalézající se na neuronech s věkem postupně klesá, ale u myší s HD se tak neděje vůbec nebo jen velmi pomalu. Stimulace P2X7 činí neurony nemocných myší náchylnější k apoptické smrti. Působení P2X7 antagonistů (především BBG) působí u experimentálních postižených myší snížení náchylnosti k apoptické smrti, úbytku tělesné hmotnosti a poklesu schopnosti správné motorické koordinace. Další oblast možného výzkumu HD ve spojení s P2X7 je glióza (v reakci na poškození dochází k nahromadění podpůrných buněk a vznik jakési jizvy), protože u HD myší bylo prokázáno větší množství reaktivních mikrogliových buněk, které také exprimují P2X7 receptor (Diaz-Hernandez a spol., 2009).

Dalším velmi závažným onemocněním je Parkinsonova choroba, která se projevuje degenerací dopaminergních neuronů a nastává tak snížení hladiny dopaminu, což je jeden z neuropřenašečů (Nicholls a spol., 2013). Následkem poklesu hladiny nastávají problémy

s pohybem např. jeho zahájením, svalovým třesem nebo svalovou ztuhlostí. Stejně jako u předešlé choroby se i zde ukázalo působení P2X7 antagonisty BBG jako nadějně. BBG má příznivý vliv na buněčné poškození a dysfunkci dopaminergních buněk vlivem toxinů a také zeslabuje astrogliózu a mikrogliózu (Carmo a spol., 2014). Dalším antagonistou, který je ve spojení s PD zkoumán je A-438079, jež může zamezit vyčerpání dopaminu, bohužel zde ale nedochází k zabránění ztrát dopaminergních buněk (Marcellino a spol., 2010). Přežití dopaminergních buněk nezlepšilo ani odstranění či inhibice P2X7 receptoru (Hracsko a spol., 2011).

Kromě těchto tří velice významných onemocnění je důležité upozornit na roli P2X7 receptoru i při jiných ohroženích nervové soustavy. Jedním z takových ohrožení je poranění spinální míchy (SCI), při kterém dochází k neurodegeneraci způsobené mikrogliemi, které pohlcují poškozené neurony na podnět ATP uvolněného z poraněných buněk. Protože mikroglie exprimují P2X7, byl zkoumán, jako v předešlých případech, vliv antagonistů. U BBG bylo prokázáno, že jeho užití snižuje gliosu či neutrofilovou infiltraci do místa zranění a také přispívá ke zlepšení motorického stavu (Peng a spol., 2009). Dalším problémem, při kterém se uplatní P2X7 receptorové antagonisté, je ischemie mozku. Ischemie je nedokrvenost nějakého orgánu nebo tkáně, v tomto případě mozku, která vede k poškození či odumření. Zvýšená exprese P2X7 byla při ischemii pozorována na astrocytech, neuronech a mikrogliích (Franke a spol., 2004). Dodáním BBG zde také došlo ke snížení poškození mozku a zlepšení symptomů ischemie (Arbeloa a spol., 2012).

4.2. Neuropatická bolest

Onemocnění nebo zranění somatosenzorického systému působí neuropatickou bolest (Jensen a spol., 2011), která se projevuje přecitlivělostí k jinak nebolestivým podnětům. Důležitou roli při vzniku neuropatické bolesti hraje P2X7 receptor. Dlouho se nevědělo, zda je tento receptor v bolesti zapojen díky schopnosti tvořit póry nebo působit jako kationový kanál. Vyjasnění přišlo s výzkumem polymorfismů, u kterých byl nalezen vliv na formování pórů. Blokace P2X7 receptoru zmírňuje bolestivé projevy (Sorge a spol., 2012). Snaha zabránit vnímání silné bolesti vedla k výzkumu látek, které by zabránily uvolňování látek spojených s vnímáním bolesti. Jednou takovou látkou je katepsin, což je lysozomální proteáza uvolňovaná z mikroglií. Blokace uvolňování katepsinu vedla ke zmírnění bolestivých projevů (Clark a spol., 2010). Úplné vyřazení P2X7 receptoru na satelitních buňkách vede ovšem ke

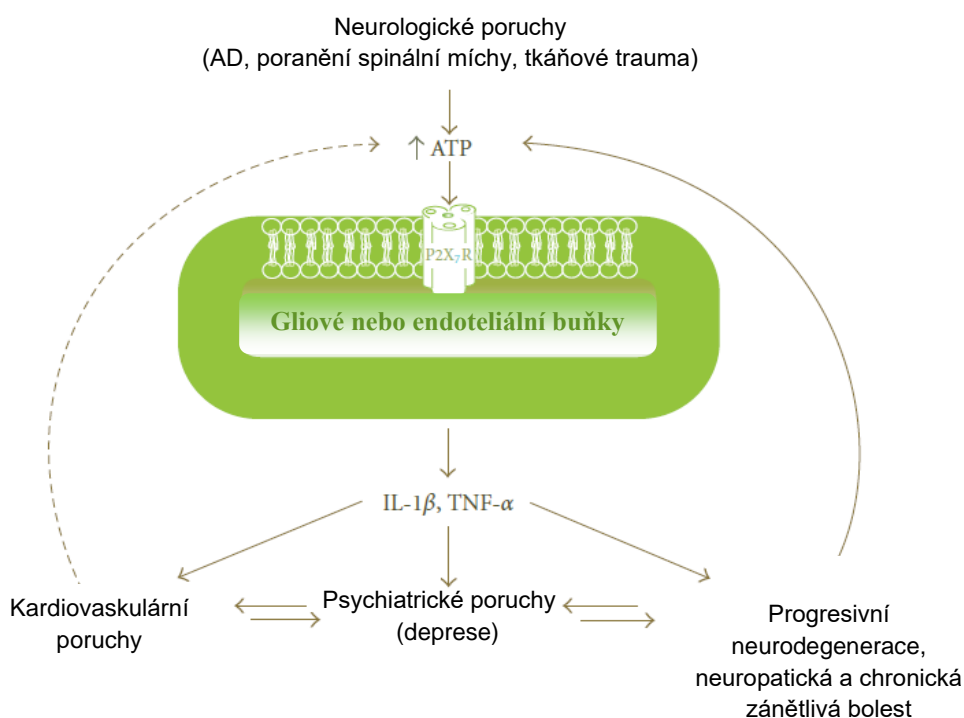
zvýšení množství P2X3 receptoru, což má vliv na zvýšení aktivity senzorických nervů, díky čemuž dochází k abnormálnímu bolestivému vnímání. P2X7 receptor tak nepůsobí na vnímání bolesti jen tak, že ji prohlubuje, ale také má jistou ochrannou funkci před silným vnímáním bolesti, proto není vhodné tento receptor zcela vyřadit, ale spíše se zaměřit na některé jeho konkrétní schopnosti, např. tvorbu pórů (Chen a spol., 2008).

4.3. Deprese

Deprese patří mezi afektivní poruchy chování a je závažným problémem dnešní civilizace. Při výzkumu sebevražd bylo zjištěno, že lidé, kteří spáchali sebevraždu a trpěli schizofrenií nebo afektivní poruchou, měli v mozku zvýšený počet mikrogliových buněk. Otázkou, na kterou studie bohužel neodpověděla, je zda zvýšený počet těchto buněk vede k sebevraždě nebo je důsledkem sebevražedných nálad (Steiner a spol., 2008). U starších lidí trpících depresí byla prokázána vyšší hladina IL-1 β . Množství IL-1 β korelovalo se závažností depresivního stavu (Thomas a spol., 2005). Změny hladiny ve spojení s depresí byly pozorovány i u jiných prozánětlivých cytokinů (jak shrnuto v Raison a spol., 2006).

Jak bylo popsáno výše, gen pro P2X7 receptor se nachází v oblasti, která je spojena s bipolárními afektivními poruchami a závažnými stavy deprese. Jde o jednonukleotidový polymorfismus G640R (Barden a spol., 2006; Lucae a spol., 2006). Při výzkumu chování myši s P2X7 knockoutovaným receptorem byly zjištěny odlišnosti od kontrolních myši. Myši s vyřazeným receptorem například v novém prostředí snědly více potravy než kontrola, což bylo způsobeno tím, že je nové prostředí neovlivňovalo tak negativně jako myši s funkčním P2X7. Rozdíl byl nalezen i v případě podání antidepressiva imipraminu, kdy KO-myši byly schopny vnímat menší množství antidepressiva než kontrolní myši. Tyto upravené myši po stimulaci uvolňování IL-1 β neposkytly žádné měřitelné hladiny tohoto cytokinu na rozdíl od normálních myši, které začaly uvolňovat zvýšené množství IL-1 β . Všechny tyto vlastnosti P2X7 knockoutovaných myši poukazují na to, že farmakologii P2X7 receptoru je nutno věnovat pozornost (Basso a spol., 2009).

Na základě zjištění o buněčné lokalizaci P2X7 receptoru, jeho schopnosti ovlivňovat produkci IL-1 β a podílet se tak na množství fyzických i psychických poruch, byla utvořena hypotéza o souvislostech mezi poruchami kardiovaskulárními, neurodegenerativními a psychickými, jejíž schéma je znázorněno na Obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: **Schéma interakce mezi nervovým a kardiovaskulárním systémem**

P2X7 receptor ovlivňuje množství IL-1 β , který je jeden z hlavních komponentů zapojených v kardiovaskulárních, neurologických a psychiatrických onemocněních. Proto vznikla hypotéza o souvislostech mezi kardiovaskulárními, neurologickými a psychiatrickými poruchami. TNF- α (tumor necrosis factor- α , faktor nádorové nekrózy α). Převzato a předěláno z (Skaper a Giusti, 2009)

5. Závěr

Tato bakalářská práce měla za cíl zmapovat výskyt a úlohy purinergního P2X7 receptoru v imunitním systému. Tento receptor se některými svými vlastnostmi významně liší od ostatních P2 receptorů. Je exprimován mnohými buňkami hematopoetické linie i buňkami nervového systému. Jeho nejznámější funkcí je účast při imunitních zánětlivých reakcích, kde může působit jako aktivátor vhodné imunitní odpovědi, ale při nepříznivých podmínkách může působit i některá závažná chronická zánětlivá onemocnění. Vzhledem k tomu, že se nachází i na mikrogliích a dalších buňkách ovlivňujících neurony, tak se velmi významně podílí na mnohých neurodegenerativních onemocněních, jako je např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba atd. Významný vliv má také na vnímání bolesti a je spojen s některými poruchami psychiky jako je např. deprese.

Onemocnění imunitního systému a neurodegenerativní onemocnění patří mezi nejzávažnější civilizační choroby, a proto je velmi důležitá znalost vlastností P2X7 receptoru, jeho agonistů, antagonistů, a jeho úlohy v konkrétních chorobách. Pokud není zdravotní problém pomocí P2X7 farmak zcela odstraněn, mohou být zmírněny alespoň některé jeho projevy. Některé imunologické děje spojené s P2X7 receptorem nejsou ještě zcela objasněny a zdá se, že jsou mnohem složitější, než se z počátku myslelo. Výzkumem tohoto receptoru může být získáno mnoho cenných poznatků, které umožní vytvoření léčebných látek a postupů u řady velmi závažných a doposud neléčitelných onemocnění.

6. Použitá literatura

- Adinolfi, E., Capece, M., Franceschini, A., Falzoni, S., Giuliani, A. L., Rotondo, A., Sarti, A. C., Bonora, M., Syberg, S., Corigliano, D., Pinton, P., Jorgensen, N. R., Abelli, L., Emionite, L., Raffaghello, L., Pistoia, V. and Di Virgilio, F. (2015). Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7. *Cancer Res*, 75(4), 635-644.
- Akira, S., Takeda, K., a Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8), 675-680.
- Allan, S. M., a Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2(10), 734-744.
- Arbeloa, J., Perez-Samartin, A., Gottlieb, M., a Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis*, 45(3), 954-961.
- Barden, N., Harvey, M., Gagné, B., Shink, E., Tremblay, M., Raymond, C., Labbé M., Villeneuve A., Rochette D., Bordeleau L., Stadler H., Holsboer F., and Müller-Myhsok B. (2006). Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24. 31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141 (4), 374-382.
- Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., a Roitt, I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, 21 Suppl 2, S12-23.
- Basso, A. M., Bratcher, N. A., Harris, R. R., Jarvis, M. F., Decker, M. W. a Rueter, L. E. (2009). Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res*, 198(1), 83-90.
- Bianchi BR., L. K., Touma E., Niforatos W., Burgard EC., Alexander KM., Park HS., Yu H., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis MF. a van Biesen T. (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European journal of pharmacology*, 376(1), 127-138.
- Bodin, P. a Burnstock, G. (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res*, 26(8-9), 959-969.
- Buell, G. N., Talabot, F., Gos, A., Lorenz, J., Lai, E., Morris, M. A. a Antonarakis, S. E. (1997). Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors & channels*, 5(6), 347-354.
- Burnstock, G. (2004). Introduction: P2 receptors. *Current topics in medicinal chemistry* 4.8, 793-803.
- Burnstock, G. (2006a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, 27(3), 166-176.
- Burnstock, G. (2006b). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S172-181.
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, 87(2), 659-797.

- Carmo, M. R., Menezes, A. P., Nunes, A. C., Pliassova, A., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Cunha, R. A., Canas, P. M. a Andrade, G. M. (2014). The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology*, 81, 142-152.
- Clark, A. K., Wodarski, R., Guida, F., Sasso, O. a Malcangio, M. (2010). Cathepsin S release from primary cultured microglia is regulated by the P2X7 receptor. *Glia*, 58(14), 1710-1726.
- Coddou, C., Stojilkovic, S. S. a Huidobro-Toro, J. P. (2011). Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci*, 22(3), 335-354.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A. a Buell, G. (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1277-1283.
- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M. N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T. a Ojcius, D. M. (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity*, 19(3), 403-412. Retrieved
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. a Kanellopoulos, J. M. (2011). The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 286(4), 2596-2606.
- Di Virgilio, F. a Vuerich, M. (2015). Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci*, 191, 117-123.
- Diaz-Hernandez, M., Diez-Zaera, M., Sanchez-Nogueiro, J., Gomez-Villafuertes, R., Canals, J. M., Alberch, J., Miras-Portugal, M. T. a Lucas, J. J. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J*, 23(6), 1893-1906.
- Dulon, D., Patrice Mollard a Jean-Marie Aran. (1991). Extracellular ATP elevates cytosolic Ca²⁺ in cochlear inner hair cells. *NeuroReport* 2, 69-72.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., a Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282-286.
- Ennion, S. J. a Richard J. Evans. (2002). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X1 receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Molecular pharmacology* 61.2, 303-311.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R. a Di Virgilio, F. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*, 159(3), 1451-1458.
- Fesce, R. a Jacopo Meldolesi. (1999). Peeping at the vesicle kiss. *Nature cell biology* 1.1, E3-E4.
- Fischer, W. a U. Krugel. (2007). P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Current medicinal chemistry* 14.23, 2429-2455.
- Franke, H., Gunther, A., Grosche, J., Schmidt, R., Rossner, S., Reinhardt, R., Faber-Zuschratter, H., Schneider, D. a Illes, P. (2004). P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(7), 686-699.

- Gallucci, S. a Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*, 13(1), 114-119.
- Gijssbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W. a Bollen, M. (2001). Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 276.2, 1361-1368.
- Hattori, M. a Eric Gouaux. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485.7397, 207-212.
- Hayman, A. R. (2008). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41.3, 218-223.
- Hracsco, Z., Baranyi, M., Csolle, C., Goloncser, F., Madarasz, E., Kittel, A. a Sperlagh, B. (2011). Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 6, 28.
- Humphreys, B. D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J. a Dubyak, G. R. (1998). Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Molecular pharmacology*, 54(1), 22-32.
- Chakfe, Y., Seguin, R., Antel, J. P., Morissette, C., Malo, D., Henderson, D. a Séguéla, P. (2002). ADP and AMP induce interleukin-1 β release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *The Journal of neuroscience*, 22(8), 3061-3069.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P. A. a Junger, W. G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 314(5806), 1792-1795.
- Chen, Y., Zhang, X., Wang, C., Li, G., Gu, Y. a Huang, L. Y. (2008). Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43), 16773-16778.
- Cheneval, D., Ramage, P., Kastelic, T., Szelestenyi, T., Niggli, H., Hemmig, R., Bachmann, M. a MacKenzie, A. (1998). Increased mature interleukin-1 β secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1 β -converting enzyme processing. *J Biol Chem*, 273(28), 17846-17851.
- Jensen, T. S., Baron, R., Haanpaa, M., Kalso, E., Loeser, J. D., Rice, A. S. a Treede, R. D. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152(10), 2204-2205.
- Jiang, L.-H., Rassendren, F., Surprenant, A. a North, R. A. (2000a). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275.44, 34190-34196.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. a Surprenant, A. (2000b). Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Molecular pharmacology*, 58(1), 82-88.
- Jindrichova, M., Bhattacharya, A., Rupert, M., Skopek, P., Obsil, T. a Zemkova, H. (2015). Functional characterization of mutants in the transmembrane domains of the rat P2X7 receptor that regulate pore conductivity and agonist sensitivity. *Journal of neurochemistry*, 133(6), 815-827.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, 11(3), 201-212.

- Kaunitz, J. D. a Dean T. Yamaguchi. (2008). TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *Journal of cellular biochemistry* 105.3, 655-662.
- Khakh, B. S. a Geoffrey Burnstock. (2009). The double life of ATP. *Scientific American* 301.6, 84-92.
- Klapperstück, M., Büttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G. a Markwardt, F. (2000). Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X 1 and P2X 7 receptors. *European journal of pharmacology*, 387(3), 245-252.
- Kukulski F., L. S., Lavoie EG., Lecka J., Bigonnesse F., Knowles AF., Robson SC., Kirley TL. a Sévigny J. (2005). Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 1.2, 193-204.
- Lazarowski, E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*, 8(3), 359-373.
- Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F. a Berman, J. W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol*, 150(7), 2659-2667.
- Lucae, S., Salyakina, D., Barden, N., Harvey, M., Gagne, B., Labbe, M., Binder, E. B., Uhr, M., Paez-Pereda, M., Sillaber, I., Ising, M., Brückl, T., Lieb, R., Holsboer, F. a Muller-Myhsok, B. (2006). P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet*, 15(16), 2438-2445.
- Marcellino, D., Suarez-Boomgaard, D., Sanchez-Reina, M. D., Aguirre, J. A., Yoshitake, T., Yoshitake, S., Hagman, B., Kehr, J., Agnati, L. F. a Fuxe K Rivera, A. (2010). On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J Neural Transm (Vienna)*, 117(6), 681-687.
- Martinon, F., Burns, K. a Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 10(2), 417-426.
- Martinon, F., Mayor, A. a Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27, 229-265.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., Beck, P., Muruve, D. A. a Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330(6002), 362-366.
- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M. a Di Virgilio, F. (1993). Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8199-8203.
- North, R. A. (1996a). Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Current opinion in cell biology* 8.4, 474-483.
- North, R. A. (1996b). P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *P2 Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanisms*, 91-109.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82(4), 1013-1067.
- Parvathenani, L. K., Tertysnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B. a Posmantur, R. (2003). P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and

- is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 278(15), 13309-13317.
- Pelegrin, P. a Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*, 25(21), 5071-5082.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., . . . Nedergaard, M. (2009). Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(30), 12489-12493.
- Perregaux, D. a Gabel, C. A. (1994). Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem*, 269(21), 15195-15203.
- Piirainen, H., Ashok Y., Nanekar RT. a Jaakola VP. (2011). Structural features of adenosine receptors: from crystal to function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808.5, 1233-1244.
- Raison, C. L., Capuron, L. a Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27(1), 24-31.
- Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., Surprenant, A. a Jiang, L. H. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res*, 44(6), 347-355.
- Sakagami H., A. J., Natori Y., Nishikawa K., Kakehi Y., Natori Y. a Arai H. (2005). Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Journal of Biological Chemistry* 280.24, 23084-23093.
- Sanz, J. M. a Di Virgilio, F. (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 β release from microglial cells. *J Immunol*, 164(9), 4893-4898.
- Sanz, J. M., Falzoni, S., Rizzo, R., Cipollone, F., Zuliani, G. a Di Virgilio, F. (2014). Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 60, 117-119.
- Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L. a Di Virgilio, F. (2009). Activation of microglia by amyloid { β } requires P2X7 receptor expression. *J Immunol*, 182(7), 4378-4385.
- Sim, J. A., Young, M. T., Sung, H. Y., North, R. A. a Surprenant, A. (2004). Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci*, 24(28), 6307-6314.
- Skaper, S. D. a Giusti, P. (2009). P2X(7) Receptors as a Transducer in the Co-Occurrence of Neurological/Psychiatric and Cardiovascular Disorders: A Hypothesis. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2009, 545263.
- Sorge, R. E., Trang, T., Dorfman, R., Smith, S. B., Beggs, S., Ritchie, J., Austin, J. S., Zaykin, D. V., Vander Meulen, H., Costigan, M., Herbert, T.A., Yarkoni-Abitbul, M., Tichauer, D., Livneh, J., Gershon, E., Zheng, M., Tan, K., John, S. L., Slade, G. D., Jordan, J., Woolf, C. J., Peltz, G., Maixner, W., Diatchenko, L., Seltzer, Z., Salter, M.

- W. and Herbert, T. A. (2012). Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nature medicine*, 18(4), 595-599.
- Sorge, R. E., T. T., Dorfman R., Smith SB., Beggs S., Ritchie J., Austin JS., Zaykin DV., Vander Meulen H., Costigan M., Herbert TA., Yarkoni-Abitbul M., Tichauer D., Livneh J., Gershon E., Zheng M., Tan K., John SL., Slade GD., Jordan J., Woolf CJ., Peltz G., Maixner W., Diatchenko L., Seltzer Z., Salter MW., and Mogil JS. (2012). Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nature medicine*, 18(4), 595-599.
- Sperlgh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K., & Illes, P. (2006). P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 78(6), 327-346.
- Stagg J., D. U., McLaughlin N., Sharkey J., Pommey S., Denoyer D., Dwyer KM. a Smyth MJ. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.4, 1547-1552.
- Stefan, C., Silvia Jansen a Mathieu Bollen. (2006). Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic signalling* 2.2, 361-370.
- Steiner, J., Biela, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., Bernstein, H. G. a Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*, 42(2), 151-157.
- Stokes, L., Fuller, S. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Gu, B. J. a Wiley, J. S. (2010). Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1 β secretion. *The FASEB Journal*, 24(8), 2916-2927.
- Surprenant, A. a North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*, 71, 333-359.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. a Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272(5262), 735-738.
- Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K. a Nakata, Y. (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci*, 24(1), 1-7.
- Thomas, A. J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R. a O'Brien, J. T. (2005). Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am J Psychiatry*, 162(1), 175-177.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J.R., Aunins, J., a spol. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768-774.
- Torres, G. E., Terrance M. Egan a Mark M. Voigt. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits specificities exist with regard to possible partners. *Journal of Biological Chemistry* 274.10, 6653-6659.
- Tu, J. a Wang, L. P. (2009). Therapeutic potential of extracellular ATP and P2 receptors in nervous system diseases. *Neurosci Bull*, 25(1), 27-32.
- Tvrdoňová, V. (2008). Mezibuněčná a vnitrobuněčná úloha adenosin-5'-trifosfátu. *Bakalářská práce PrF UK Praha, Klinická a toxikologická analýza*.

- Urano, T., Nishimori, H., Han, H. J., Furuhata, T., Kimura, Y., Nakamura, Y. a Tokino, T. (1997). Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer research*, 57(15), 3281-3287.
- Valera S., H. N., Evans RJ., Adami N., North RA., Surprenant A. a Buell G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.
- Vial, C., Jonathan A. Roberts a Richard J. Evans. (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 25.9, 487-493.
- Virginio, C., Church, D., North, R. A. a Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X 7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1285-1294.
- Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. X. A. a Surprenant, A. (1999). Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *The Journal of physiology*, 335-346.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. a North, R. A. (1998). Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Molecular Pharmacology*, 53(6), 969-973.
- von Kugelgen, I. a Wetter, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 310-323.
- Yegutkin, G. G. (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49(6), 473-497.
- Zhang, X. F., Han, P., Faltynek, C. R., Jarvis, M. F. a Shieh, C. C. (2005). Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Res*, 1052(1), 63-70.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 299-309.
- Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.

Učebnice:

- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T. a Špíšek, R. (2013). Základy imunologie, Vyd 5., Triton. Praha
- Nicholls, G. J., Martin, R. A., Wallace, G. B. a Fuchs, A. P. (2013). Od neuronu k mozku. Academia. Praha